

10/594250

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005285

International filing date: 23 March 2005 (23.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-090644
Filing date: 25 March 2004 (25.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 22 July 2005 (22.07.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

28.6.2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2004年 3月25日

出 願 番 号
Application Number: 特願2004-090644

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

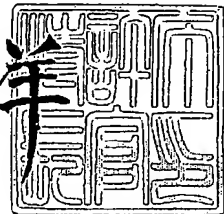
JP2004-090644

出 願 人
Applicant(s): 独立行政法人科学技術振興機構

2005年 5月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 A181P125
【提出日】 平成16年 3月25日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
C12N 15/05
【発明者】
 【住所又は居所】 岡山県倉敷市有城 1 1 6 9 - 1 7 1
 【氏名】 武田 和義
【発明者】
 【住所又は居所】 岡山県倉敷市有城 1 1 6 9 - 4 0
 【氏名】 佐藤 和広
【特許出願人】
 【識別番号】 503360115
 【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代理人】
 【識別番号】 100080034
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 原 謙三
 【電話番号】 06-6351-4384
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 003229
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0316432

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

オオムギのゲノム DNA 中に存在し、大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーであって、

上記大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座から 0 ないし 14 センチモルガンの範囲内の距離に位置することを特徴とする遺伝マーカー。

【請求項 2】

上記ゲノム DNA が 1 H 染色体であることを特徴とする請求項 1 に記載の遺伝マーカー。

【請求項 3】

配列番号 1 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 2 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第一プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の遺伝マーカー。

【請求項 4】

配列番号 3 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 4 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第二プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の遺伝マーカー。

【請求項 5】

上記ゲノム DNA が 3 H 染色体であることを特徴とする請求項 1 に記載の遺伝マーカー。

【請求項 6】

配列番号 5 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 6 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第三プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする請求項 1 または 5 に記載の遺伝マーカー。

【請求項 7】

配列番号 7 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 8 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第四プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする請求項 1 または 5 に記載の遺伝マーカー。

【請求項 8】

請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝マーカーを用いて大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含む DNA 断片を単離することを特徴とする DNA 断片の単離方法。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の単離方法により得られた上記大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含む DNA 断片を、オオムギのゲノム DNA に導入することを特徴とする大麦縞萎縮病抵抗性オオムギの生産方法。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の大麦縞萎縮病抵抗性オオムギの生産方法によって得られた大麦縞萎縮病抵抗性オオムギ。

【請求項 11】

請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝マーカーを指標として、大麦縞萎縮病抵抗性オオムギを選抜する方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規遺伝マーカーおよびその利用法に関するものであり、特に、オオムギにおける大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーと、その利用に関するものである。

【背景技術】

【0002】

大麦縞萎縮病は、オオムギ縞萎縮ウイルス (barley yellow mosaic virus; 以下BaYMVと略す) またはオオムギマイルドモザイクウイルス (barley mild mosaic virus; 以下BaMMVと略す) を原因ウイルスとし、藻菌類のポリミキサ・グラミニス (*Polymyxa graminis*) によって媒介される土壌伝染性のウイルス病である。発病すると葉の壊死斑点や黄変、分けつの減少、生育不良、枯死等を招き、しかも、一度発生するとその土壌は4～5年休作しても無病化しないため、深刻な問題となっている。特にビール用オオムギで発生しやすく、ビール用オオムギの栽培が多くなるにつれ、わが国のみならず、中国やドイツでも発生が問題となっており、発生のない国においても、発病に備えて抵抗性の付与が積極的に考えられている。そのため、大麦縞萎縮病抵抗性は極めて重要な育種目標となっている。

【0003】

現在、大麦縞萎縮病の最良の防除法は抵抗性品種の栽培であり、汚染圃場では耐病性の強い品種が栽培される。従来、作物の育種は目標形質を有する栽培品種や野生種等を交配し、多数の個体を実際に栽培して目標形質を有する個体を選抜し、当該目標形質を遺伝的に固定化しなければならず、広大な圃場や多大な人力、相当の年月が必要であった。例えば、BaYMVに対する大麦縞萎縮病抵抗性を目標形質とした場合には、BaYMVの人工接種が困難であるために、育成系統に大麦縞萎縮病抵抗性遺伝子が導入されているか否かを土壌にBaYMVを感染させた圃場で検定し、抵抗性を有する個体を選抜しなければならず、時間と手間が必要とされていた。

【0004】

そこで、近年は育種期間の短縮、労働力および圃場面積の縮減、有用遺伝子の確実な選抜を図るため、遺伝マーカーを指標とした選抜による育種法が用いられるようになってきた。このような遺伝マーカーによる育種では、マーカーの遺伝子型により幼苗段階で選抜が可能となり、実際に土壌に大麦縞萎縮病ウイルスを感染させた圃場で栽培する必要がなく、目標形質の有無の確認も容易となる。したがって、遺伝マーカーを利用すれば効率的な育種が実現可能である。そして、遺伝マーカーを利用した育種を実現するためには、目標形質に強く連鎖した遺伝マーカーの開発が必須となる。

【0005】

ところで、大麦縞萎縮病抵抗性などの農業上重要な形質の多くは、雑種後代で連続的な変異を示すものが多い。このような形質は、時間や長さなどの量的な尺度で測定されるので量的形質と呼ばれている。量的形質は一般に、単一主働遺伝子支配の形質ではなく、複数の遺伝子の作用によって決定されている場合が多い。作物の育種において改良対象とされる形質の多く、例えば収量や品質・食味等はこの量的形質であることが多い。

【0006】

このような量的形質を司る遺伝子が染色体上に占める遺伝的な位置をQTL (Quantitative Trait Loci、量的形質遺伝子座) と称する。QTLを推定する方法として、QTLの近傍に存在する遺伝マーカーを利用するQTL解析が用いられる。かかるQTL解析は、染色体上のどの領域が目的とする量的形質に影響しているかを統計的に解析し、その領域の近傍にあるDNAマーカーを見出すことにより行われる。見出されたDNAマーカーにより作成された遺伝地図 (連鎖地図) 情報を元に、目標形質に影響を与えている領域を絞り込んでいき、最終的にその遺伝子を特定・単離することができる。1980年代後半

にDNAマーカーが登場すると、DNAマーカー利用による詳細な連鎖地図作成が大きく進み、その地図に基づいて多くの生物でQTL解析が行われるようになった。

【0007】

以上のように、目標形質に連鎖する遺伝マーカーの開発は、染色体全体をカバーできる詳細な連鎖地図に基づいた精度の高いQTL解析により可能となり、得られた遺伝マーカーを利用することにより、効率的な育種が実現できるといえる。大麦縞萎縮病抵抗性に関するQTLとしては、例えば本発明者らによって中国在来種の六条オオムギ木石港3の3H染色体長腕、4H染色体動原体付近および7H染色体短腕上に見出されている（非特許文献1）。

【非特許文献1】Chikara Miyazaki, Eiichi Osanai, Kazutoshi Ito, Takeo Konishi, Kazuhiro Sato and Akira Saito. 2001. "Mapping of quantitative trait loci conferring resistance to barley yellow mosaic virus in a Chinese barley landrace Mokusekko 3." Breeding Science 51:171-177.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

上述のように、大麦縞萎縮病抵抗性はきわめて重要な育種目標の1つである。しかし、大麦縞萎縮病抵抗性には、複数の遺伝子座が関与する場合が多いため、交配等による方法では、大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子（遺伝子座）を確実に選抜しているか否かを確認することが困難である。そこで、大麦縞萎縮病抵抗性を導入したオオムギの育種には遺伝マーカーを利用することが非常に有効である。大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーが開発され、利用可能となれば、大麦縞萎縮病抵抗性オオムギの育種の大幅な効率化を実現することが可能となる。

【0009】

本発明は、上記課題に鑑みなされたものであって、その目的は、オオムギにおける大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する新規遺伝マーカーと、その代表的な利用法とを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、上記課題を解決すべく、発明者らが有するオオムギEST配列に基づいてプライマーセットを設計し、当該プライマーセットにより増幅されるオオムギゲノム断片の多型の有無により遺伝マーカー（DNAマーカー）を開発した。さらに、醸造用オオムギ「はるな二条」と野生オオムギ「H602」の交雑F1から作出した倍加半数体（doubled haploid、以下「DH」と略記する。）集団を材料として、上記遺伝マーカー間の連鎖を検出して、当該DH系統の連鎖地図を作成し、この連鎖地図に基づいて大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座のQTL解析を行なった。その結果、大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を1H染色体上に1つ、3H染色体上に1つ検出した。本発明者らはさらに解析を進め、これら大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座にそれぞれ連鎖する新規遺伝マーカーを見いだした。すなわち本発明は、上記新規知見により完成されたものであり、以下の発明を包含する。

【0011】

すなわち本発明にかかる遺伝マーカーは、オオムギのゲノムDNA中に存在し、大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーであって、上記大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座から0ないし14センチモルガンの範囲内の距離に位置することを特徴としている。上記遺伝マーカーは、大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に強連鎖するため、当該遺伝マーカーと大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座間で分離して組み換えが起こる確率は低い。それゆえ上記遺伝マーカーを用いることによって、例えば大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片の取得、大麦縞萎縮病抵抗性オオムギの生産（作出）・判別等を行なうことが可能となる。

【0012】

さらに本発明にかかる遺伝マーカーは、上記ゲノムDNAが1H染色体であることを特徴としている。それゆえ上記遺伝マーカーを用いることによって、オオムギの1H染色体上に存在する大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片の取得、大麦縞萎縮病抵抗性オオムギの生産（作出）・判別等を行なうことが可能となる。

【0013】

さらに本発明にかかる遺伝マーカーは、配列番号1に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号2に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第一プライマーセットを用いて増幅されることを特徴としている。上記第一プライマーセットを用いてPCR等の増幅反応を行なえば当該遺伝マーカーを容易に増幅・検出することが可能となり、大麦縞萎縮病抵抗性オオムギの判別を容易に行なうことができる。

【0014】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、配列番号3に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号4に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第二プライマーセットを用いて増幅されることを特徴としている。上記第二プライマーセットを用いてPCR等の増幅反応を行なえば当該遺伝マーカーを容易に増幅・検出することが可能となり、大麦縞萎縮病抵抗性オオムギの判別を容易に行なうことができる。

【0015】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、上記ゲノムDNAが3H染色体であることを特徴としている。それゆえ上記遺伝マーカーを用いることによって、オオムギの3H染色体上に存在する大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片の取得、大麦縞萎縮病抵抗性オオムギの生産（作出）・判別等を行なうことが可能となる。

【0016】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、配列番号5に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号6に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第三プライマーセットを用いて増幅されることを特徴としている。上記第三プライマーセットを用いてPCR等の増幅反応を行なえば当該遺伝マーカーを容易に増幅・検出することが可能となり、大麦縞萎縮病抵抗性オオムギの判別を容易に行なうことができる。

【0017】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、配列番号7に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号8に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第四プライマーセットを用いて増幅されることを特徴としている。上記第四プライマーセットを用いてPCR等の増幅反応を行なえば当該遺伝マーカーを容易に増幅・検出することが可能となり、大麦縞萎縮病抵抗性オオムギの判別を容易に行なうことができる。

【0018】

一方、本発明にかかるDNA断片の単離方法は、上記本発明にかかる遺伝マーカーを用いて大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片を単離することを特徴としている。本発明にかかる遺伝マーカーは大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に強連鎖するものであり、上記遺伝マーカーを目標にクローニングを行なえば、大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片を容易に単離することが可能となる。

【0019】

また本発明にかかる大麦縞萎縮病抵抗性オオムギの生産方法は、上記本発明にかかるDNA断片の単離方法により得られた上記大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片を、オオムギのゲノムDNAに導入することを特徴としている。当該生産方法により、大麦縞萎縮病抵抗性オオムギを生産することが可能となる。

【0020】

また本発明にかかる大麦縞萎縮病抵抗性オオムギは、上記本発明にかかる大麦縞萎縮病抵抗性オオムギの生産方法によって得られることを特徴としている。当該大麦縞萎縮病抵抗性オオムギによれば、大麦縞萎縮病に対する抵抗性を有する個体の選抜が容易かつ確実となるため、大麦縞萎縮病によるオオムギの収量減少を防ぐことができる。

【0021】

また本発明にかかる大麦縞萎縮病抵抗性オオムギを選抜する方法は、上記本発明にかかる遺伝マーカーを指標として、大麦縞萎縮病抵抗性オオムギを選抜する方法である。上記本発明にかかる遺伝マーカーは、大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に強連鎖するため、当該遺伝マーカーと大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座間で分離して組み換えが起こる確率が非常に低い。それゆえ上記遺伝マーカーを検出することによって、試験対象オオムギにおける大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座の遺伝子型を容易に判別することができ、選抜すべき個体を容易に見出すことが可能となる。

【発明の効果】

【0022】

本発明にかかる遺伝マーカーは、大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座と連鎖するため、当該遺伝マーカーを指標として大麦縞萎縮病抵抗性を導入したオオムギの育種を可能とする。したがって、大麦縞萎縮病抵抗性オオムギの効率的な育種を実現できるという効果を奏する。より具体的には、幼苗段階で目的個体を選抜できるため、実際に土壌に大麦縞萎縮病ウイルスを感染させた圃場でオオムギを栽培し、各個体の大麦縞萎縮病抵抗性を観察した後に目的の個体を選抜する必要がなくなり、育種期間を短縮できるという効果を奏する。また、複数の遺伝子座を同時に選抜できるために、観察によって選抜するよりも、確実に目的とする遺伝子型を得ることができる。さらに、労働力および圃場面積を縮減できるという効果を奏する。

【0023】

さらに、上記遺伝マーカーを指標として選択的に育種された大麦縞萎縮病抵抗性オオムギは、大麦縞萎縮病ウイルスに汚染されている土壌においても栽培が可能であるため、安定した収量を確保できるという効果を奏する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

本発明の実施の一形態について説明すれば、以下のとおりである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

【0025】

本発明は、オオムギにおける大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーとその利用の一例とに関するものである。以下、本発明にかかる遺伝マーカー、本発明の利用の一例について説明する。

【0026】

(1) 本発明にかかる遺伝マーカー

本発明にかかる遺伝マーカーは、オオムギのゲノムDNA中に存在し、大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖しているものであればよい。

【0027】

大麦縞萎縮病は、前述のように、BaYMVまたはBaMMVを原因ウイルスとし、藻菌類のポリミキサ・グラミニス (*Polymyxa graminis*) によって媒介される土壌伝染性のウイルス病である。大麦縞萎縮病は、葉の壊死斑点や黄変、分けつの減少、生育不良、枯死等を招き、しかも、一度発生するとその土壌は4～5年休作しても無病化せず、収量に甚大な影響を与えるため、深刻な病害の1つである。したがって、大麦縞萎縮病抵抗性はきわめて重要な育種目標である。

【0028】

大麦縞萎縮病抵抗性は量的形質であり、複数の遺伝子座により決定される形質である。量的形質はQTL解析により、当該量的形質に関与している遺伝子座の染色体上の位置を推定することができる。以下、本発明者らがオオムギにおいて開発した大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座と連鎖する遺伝マーカーについて詳細に説明する。なお、本発明に係る遺伝マーカーはこれらに限定されるものではない。

【0029】

本発明者らは、醸造用オオムギ「はるな二条」と野生オオムギ「H602」との交雑F₁から作出した倍加半数体(DH)集団を用いて、高密度連鎖地図を作成した。すなわち

、本発明者らが有するオオムギEST (expressed sequence tag) 配列に基づいて設計されたプライマーセットを用いてオオムギゲノムDNAを増幅し、「はるな二条」と「H602」との間に増幅断片長の多型を有するものや、増幅断片長の制限酵素による消化のパターンが異なる多型を有するものを特定し、これらのDNAマーカを含む約500遺伝子座からなる連鎖地図を構築した。この連鎖地図および本発明者らが観察した上記DH集団93個体についての大麦縞萎縮病抵抗性のデータに基づいて、大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座のQTL解析を行った。その結果、大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を1H染色体上に1つ、3H染色体上に1つ検出した。本発明に係る遺伝マーカーは1H染色体上に座乗する大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を挟み、最も近傍に位置する2つの遺伝マーカーと、3H染色体上に座乗する大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を挟み、最も近傍に位置する2つの遺伝マーカーである。発明者らは1H染色体上に検出された大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーを「k00256」および「k02948」、3H染色体上に検出された大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーを「k04143」、「k00169」と命名した。

【0030】

k00256は、
CTTGGCCTTGATCTTCTGCT (配列番号1) に示される塩基配列を有するプライマー、および
GACCGTGTCAGGAAAGCAAT (配列番号2) に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第一プライマーセットを用いてオオムギゲノムDNAを鋳型として増幅されるDNAマーカであり、上記1H染色体上に検出された大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座から短腕側に約7.8センチモルガン (以下cMと表示する) の距離に座乗している。上記プライマー配列は、発明者らが独自に開発したオオムギEST配列の1つ (ESTクローン名: baaklj14、配列番号15) に基づいて設計されている。図1に当該ESTの塩基配列を示した。下線を付した部分が上記プライマー配列 (配列番号1) および上記プライマー配列 (配列番号2) の相補配列である。はるな二条の増幅産物とH602の増幅産物との間にSNP (single nucleotide polymorphisms; 一塩基多型) がある。図2に両者の増幅産物の塩基配列のうち、上記SNPを含む部分の塩基配列を示した。上がH602の塩基配列 (配列番号9) であり、下がはるな二条の塩基配列 (配列番号10) である。□で囲んだ塩基がSNPである。下線部が制限酵素PstIの認識配列 (CTGCAG) を示す。図2から明らかなように、H602の増幅産物は制限酵素PstIの認識配列 (CTGCAG) を有しているためPstIで切断されるが、はるな二条の増幅産物は上記認識配列部分のGがAに変異しているため (CTGCAA) 制限酵素PstIで切断されない。すなわち、本遺伝マーカーk00256は、CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) マーカーであり、上記第一プライマーセットによる増幅と、増幅産物の制限酵素PstI切断により、対象個体が当該1H染色体に座乗する大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、はるな二条型の遺伝子型を有するか、H602型の遺伝子型を有するかを判別できる。

【0031】

k02948は、
TCTTTCCTGGGTTGGTGAAC (配列番号3) に示される塩基配列を有するプライマー、および
GCAGCTTTTGAGTTCGTTCC (配列番号4) に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第二プライマーセットを用いてオオムギゲノムDNAを鋳型として増幅される遺伝マーカーであり、上記1H染色体上に検出された大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座から長腕側に約0.0cMの距離に座乗している。上記プライマー配列は、発明者らが独自に開発したオオムギEST配列の1つ (ESTクローン名: bag s32m16、配列番号16) に基づいて設計されている。図3に当該ESTの塩基配列を示した。下線を付した部分が上記プライマー配列 (配列番号3) および上記プライマー配列 (配列番号4) の相補配列である。はるな二条の増幅産物とH602の増幅産物との間に断

片長多型があり、はるな二条のゲノムDNAを鋳型として増幅される断片のサイズは約430bp、H602のゲノムDNAを鋳型として増幅される断片のサイズは約400bpと異なる。図4に第二プライマーセットを用いてPCRにより増幅した断片の電気泳動像を示した。図4の上段、下段とも両端は分子量マーカである。図4上段は、左端(分子量マーカを除く)から順に、はるな二条、H602、はるな二条とH602の交雑F1、DH集団の1~45の増幅断片である。図4下段は、左端(分子量マーカを除く)から順に、DH集団の46~93の増幅断片である。図4から明らかなように、増幅産物のサイズを確認することにより、対象個体が当該1H染色体に座乗する大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、はるな二条型の遺伝子型を有するか、H602型の遺伝子型を有するかを判別できる。

【0032】

k04143は、
CTGTTTGGATGACTGCGAGA (配列番号5) に示される塩基配列を有するプライマー、および
ATTACGCAACCTGATGGAGC (配列番号6) に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第三プライマーセットを用いてオオムギゲノムDNAを鋳型として増幅される遺伝マーカーであり、上記3H染色体上に検出された大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座から短腕側に約0.0ないし13.1cMの距離に座乗している。上記プライマー配列は、発明者らが独自に開発したオオムギEST配列の1つ(ESTクローン名:bah41103、配列番号17)に基づいて設計されている。図5に当該ESTの塩基配列を示した。下線を付した部分が上記プライマー配列(配列番号5)および上記プライマー配列(配列番号6)の相補配列である。はるな二条の増幅産物とH602の増幅産物との間にSNPがある。図6に両者の増幅産物の塩基配列のうち、上記SNPを含む部分の塩基配列を示した。上がH602の塩基配列(配列番号11)であり、下がはるな二条の塩基配列(配列番号12)である。□で囲んだ塩基がSNPである。下線部が制限酵素ApaIの認識配列(GTGCAC)を示す。図6から明らかなように、H602の増幅産物は制限酵素ApaIの認識配列(GTGCAC)を有しているためApaIで切断されるが、はるな二条の増幅産物は上記認識配列部分のGがAに変異しているため(ATGCAC)制限酵素ApaIで切断されない。すなわち、本遺伝マーカーk04143は、CAPSマーカーであり、上記第三プライマーセットによる増幅と、増幅産物の制限酵素ApaI切断により、対象個体が当該3H染色体に座乗する大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、はるな二条型の遺伝子型を有するか、H602型の遺伝子型を有するかを判別できる。

【0033】

k00169は、
ACCCCGGAAGCTAAGATGAT (配列番号7) に示される塩基配列を有するプライマー、および
AGTCGGAACATGCGGTACAC (配列番号8) に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第四プライマーセットを用いてオオムギゲノムDNAを鋳型として増幅される遺伝マーカーであり、上記3H染色体上に検出された大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座から長腕側に約0.3ないし13.4cMの距離に座乗している。上記プライマー配列は、発明者らが独自に開発したオオムギEST配列の1つ(ESTクローン名:baak14i02、配列番号18)に基づいて設計されている。図7に当該ESTの塩基配列を示した。下線を付した部分が上記プライマー配列(配列番号7)および上記プライマー配列(配列番号8)の相補配列である。はるな二条の増幅産物とH602の増幅産物との間にSNPがある。図8に両者の増幅産物の塩基配列のうち、上記SNPを含む部分の塩基配列を示した。上がH602の塩基配列(配列番号13)であり、下がはるな二条の塩基配列(配列番号14)である。□で囲んだ塩基がSNPである。下線部が制限酵素AluIの認識配列(AGCT)を示す。図8から明らかなように、H602の増幅産物は制限酵素AluIの認識配列(AGCT)を有しているためAluIで切断されるが、は

るな二条の増幅産物は上記認識配列部分のTがCに変異しているため (AGCC) 制限酵素A1uIで切断されない。すなわち、本遺伝マーカーk00169は、CAPSマーカーであり、上記第四プライマーセットによる増幅と、増幅産物の制限酵素A1uI切断により、対象個体が当該3H染色体に座乗する大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、はるな二条型の遺伝子型を有するか、H602型の遺伝子型を有するかを判別できる。

【0034】

ここで、1センチモルガン (1cM) とは、2つの遺伝子座の間に1%の頻度で交叉が起きるときの、両遺伝子座間の距離を表す単位である。

【0035】

ところで、増幅に際して鋳型として用いられるゲノムDNAは、植物体より従来公知の方法で抽出可能である。具体的には、植物体からゲノムDNAを抽出するための一般法 (Murray, M.G. and W.F. Thompson (1980) Nucleic Acids Res. 8:4321-4325. など参照) が好適な例として挙げられる。また、上記のゲノムDNAは、根、茎、葉、生殖器官など、オオムギの植物体を構成するいずれの組織を用いても抽出可能である。また、場合によってはオオムギのカルスから抽出してもよい。なお、上記生殖器官には、花器官 (雄性・雌性生殖器官を含む) や種子も含まれる。ゲノムDNAの抽出は、例えば、オオムギの幼苗期の葉を用いて行われる。この理由としては、組織の摩砕が比較的容易であり、多糖類などの不純物の混合割合が比較的少なく、また、種子から短期間で育成可能である点が挙げられる。さらに、幼苗段階で個体の選抜が可能となり、育種期間を大幅に短縮できる点が挙げられる。

【0036】

またオオムギのゲノムDNAを鋳型とし、上記プライマーの組み合わせを用いて増幅する方法は、従来公知のDNA増幅法を採用することができる。一般には、PCR法 (ポリメラーゼ連鎖反応法) や、その改変法が用いられる。PCR法や、その改変法を用いる際の反応条件は特に限定されるものではなく、通常と同様の条件下で増幅することができる。

【0037】

(2) 本発明の利用

[大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片の単離方法]

上述のとおり本発明にかかる遺伝マーカー (k00256、k02948) は、オオムギ1H染色体上に検出された大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖するものである。一方本発明にかかる遺伝マーカー (k04143、k00169) は、オオムギ3H染色体上に検出された大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖するものである。よって、k00256、k02948の遺伝マーカーを用いることによってオオムギ1H染色体上に検出された大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片を単離することができ、k04143、k00169の遺伝マーカーを用いることによってオオムギ3H染色体上に検出された大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片を単離することができる。

【0038】

単離とは、目的のDNA断片、すなわち大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片をクローニングすることを意味することはいうまでもないが、広義には交雑F1集団から戻し交配等により、両親のうち一方の大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片を有する個体を選抜し、その遺伝子座領域のみを目的品種に導入する同質遺伝子系統の作製も単離に含まれる。

【0039】

本発明にかかる遺伝マーカーを用いて大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片を単離する方法としては特に限定されるものではないが、例えば次のような方法を挙げることができる。

【0040】

オオムギでは本発明者らが開発を進めている「はるな二条」を含めて、ゲノムDNAのBACライブラリーが2種類作成されており、現在複数のBACライブラリーが開発中である。そこで、このようなBACライブラリーを用いて、従来公知のマップベースクロニングの手法にしたがって、大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座と当該遺伝子座に連鎖する本発明の遺伝マーカーとで当該マーカーを含むBACクローンを同定し、そこからBACのコンティグを作成して塩基配列を確定することにより、最終的に大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に到達することができる。

【0041】

また、上述のように、交雑F₁に一方の親を戻し交配することにより、他方の親の大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片を目的品種に導入して（広義の）単離をすることができる。

【0042】

なお、上記方法をはじめとする大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片を単離する際には、目的とする大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に対してなるべく近傍に座乗する遺伝マーカーを選択して用いることが好ましい。目的とする大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座と遺伝マーカーの間で組み換えが起こる確率がより低くなり、より確実に大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含む断片を単離することができるからである。

【0043】

〔大麦縞萎縮病抵抗性オオムギの生産方法、および当該生産方法によって得られた大麦縞萎縮病抵抗性オオムギ〕

上記本発明にかかる大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片の単離方法によって得られた大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片をオオムギのゲノムDNAに導入することによって、大麦縞萎縮病抵抗性改変オオムギを生産することが可能である。ただし、大麦縞萎縮病抵抗性オオムギを生産するためには、大麦縞萎縮病抵抗性の品種から上記大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片を単離し、大麦縞萎縮病感受性の品種に導入することが必要である。

【0044】

上記DNA断片を導入する方法は特に限定されるものではなく、公知の方法を適宜選択して用いることができる。より具体的には、例えばアグロバクテリウムまたはパーティクルガンを用いる方法を挙げることができる。例えば、雑誌The Plant Journal(1997) 11(6), 1369-1376 には、Sonia Tingay等により、Agrobacterium tumefaciens を用いてオオムギを形質転換する方法が開示されており、この方法を利用して形質転換オオムギを生産可能である。

【0045】

また、大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座の遺伝子型が抵抗性であるオオムギ個体と、当該DNA断片を導入しようとする大麦縞萎縮病感受性オオムギ個体との交雑により、抵抗性オオムギ個体の大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片を導入することも可能である。

【0046】

本発明にかかる大麦縞萎縮病抵抗性オオムギは、上記本発明にかかる生産方法により得られるものである。上記本発明にかかる生産方法によれば、容易かつ確実に大麦縞萎縮病抵抗性オオムギを作出することができるため、大麦縞萎縮病の発生を未然に防ぐことができ、収量の安定した増大に寄与することができる。

【0047】

〔大麦縞萎縮病抵抗性オオムギの選抜方法〕

本発明にかかる大麦縞萎縮病抵抗性オオムギの選抜方法は、上記本発明にかかる遺伝マーカーを指標として大麦縞萎縮病抵抗性オオムギを選抜する方法であればよく、その他の工程、条件、材料等は特に限定されるものではない。例えば、従来公知の作物育種法を利用することができる。

【0048】

より具体的には、例えば、交配等により作出したオオムギのゲノムDNAを抽出し、本発明に係る遺伝マーカーの遺伝子型を指標としてオオムギを選抜する方法が挙げられる。遺伝マーカーを検出する手段としては、例えば、対象とするオオムギから抽出したゲノムDNAを鋳型として上記第一ないし第四プライマーセットのいずれかをを用いて増幅したDNA断片について、断片長または断片の制限酵素消化パターンの観察を挙げることができる。

【0049】

なお本発明は上述した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

【実施例】

【0050】

〔使用植物〕

醸造用オオムギ「はるな二条」(Hordeum vulgare ssp. vulgare variety Harunanijo)と野生オオムギ「H602」(Hordeum vulgare ssp. spontaneum H602)との交配から得られたF1の花粉を培養して半数体(haploid)を育成し、自然倍加した倍加半数体(doubled haploid)93個体からなる集団を使用した。

【0051】

〔連鎖地図の作成〕

本発明者らが有するオオムギEST配列約12万をphredによって再度ベースコールした後、quality score 20でトリミングし、ベクターマスキングを行って3'端約6万配列を得た。これらの配列からphrapによってcontig 8,753、singlet 6,686からなるUnigeneを作成した。プライマー作成ソフトPrimer3によって、400bpを中心として150-500bpのcDNA配列を増幅するプライマーセット約11,000を作成した。このうち約5,100のプライマーセットについて、はるな二条とH602との間に増幅されるゲノム断片の多型の有無を検出するために、それぞれのゲノムDNAをPCR増幅し、アガロースゲル電気泳動によってバンドの有無、バンド数、バンドサイズを調査し、マーカーとなり得るものを選択した。さらに、バンドサイズに多型のない場合は、増幅断片をダイレクトシーケンスすることにより塩基配列の差異を検出し、39種類の制限酵素に対してCAPS(cleaved amplified polymorphic sequence)化が可能なものをマーカーとして選択した。

【0052】

以上により、上記はるな二条とH602との交雑F1由来のDH集団について、合計499遺伝子座のマーカーからなる連鎖地図を構築した。この連鎖地図の平均マーカー密度は3.0cM/locus、全長は1,470cMである。

【0053】

〔遺伝子型の判定〕

DH集団各個体の遺伝子型の判定は、上記DH集団の連鎖地図にマッピングされたマーカーを用いて行った。すなわち、各個体の新鮮な葉の組織から分離したDNAを鋳型として、EST配列に基づいて設計したプライマーセットを用いてPCRを行った。断片長多型マーカーについてはPCR産物の電気泳動により遺伝子型を判定した。CAPS(cleaved amplified polymorphic sequence)マーカーについては、PCR産物を制限酵素で消化し、電気泳動により遺伝子型を判定した。

【0054】

〔大麦縞萎縮病抵抗性の検定〕

大麦縞萎縮病の発病が顕著に認められる岡山大学資源生物科学研究所の圃場において、DH集団の各系統およびH602、はるな二条を栽培した。その後、3月初旬に各系統のモザイク病斑を肉眼で確認してスコア化し、大麦縞萎縮病抵抗性の程度とした。スコアは、モザイク病斑の程度で以下のように分類した。

スコア1(高度抵抗性):モザイクを全く認めない

スコア2 (抵抗性) : 部分的にわずかなモザイクが認められる

スコア3 (抵抗性中位) : モザイクが容易に認められる

スコア4 (罹病性) : 強いモザイクが認められる

スコア5 (高度罹病性) : 顕著なモザイクが認められる

なお、大麦縞萎縮病に対し高度抵抗性を有する中国在来種の六条オオムギ木石港3および大麦縞萎縮病に対し高度罹病性を有する醸造用二条オオムギあまぎ二条を対照として用いた。

【0055】

〔QTL解析〕

QTL解析のアルゴリズムには、シンプルインターバルマッピング (simple interval mapping、以下「SIM」と略記する。) とコンポジットインターバルマッピング (composite interval mapping以下「CIM」と略記する。) を用い、解析ソフトウェアにはそれぞれ、MAPMAKER/QTLとQTL Cartographerを用いた。LODスコアの閾値を2に設定し、LODスコアが2を超えた場合に当該2つのマーカー区間の最もLODの大きな位置にQTLの存在を推定した。

【0056】

〔結果〕

結果を表1に示した。表1から明らかなように、SIMにより大麦縞萎縮病抵抗性に関与する2つのQTLが検出された。また、CIMにより大麦縞萎縮病抵抗性に関与する1つのQTLが検出された。ただし、SIMおよびCIMにより3H染色体上に検出されたQTLは、どちらも同じマーカーに挟まれる位置に検出されたため、同一のQTLであると考えられる。したがって、大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座についてのQTL解析の結果、1H染色体上に1つのQTL、3H染色体上に1つのQTLが検出されたことになる。SIMにより1H染色体上に検出されたQTLは、遺伝マーカーk00256から7.8cMの位置で遺伝マーカーk02948に挟まれる位置に座乗し、LODスコアは2.5である。このQTLで表現型の分散の12.5%を説明できる。また、このQTLの存在で大麦縞萎縮病抵抗性がスコア0.4弱くなる。SIMにより3H染色体上に検出されたQTLは、遺伝マーカーk04143から0.0cMの位置で遺伝マーカーk00169に挟まれる位置に座乗し、LODスコアは4.4である。このQTLで表現型の分散の2.1%を説明できる。また、このQTLの存在で大麦縞萎縮病抵抗性がスコア0.5強くなる。CIMにより3H染色体上に検出されたQTLは、遺伝マーカーk04143から13.1cMの位置で遺伝マーカーk00169に挟まれる位置に座乗し、LODスコアは2.2である。このQTLで表現型の分散の34.7%を説明できる。また、このQTLの存在で大麦縞萎縮病抵抗性がスコア0.9強くなる。

【0057】

【表1】

Trait	Algorithm	Chromo- some	Marker interval (M1-A-QTL-B-M2)	Distance (cM)A+B (cM)	Position ^{a)} (cM)A	Position LOD ^{b)} score	Var. ^{c)} score (%)	Weight ^{d)}
Resistance to BaYMV	SIM	1H	k00256-k02948	7.8	7.8	0.0	2.5	12.5
		3H	k04143-k00169	13.4	0.0	13.4	4.4	2.1
	CIM	3H	k04143-k00169	13.4	13.1	0.3	2.2	34.7

a): Distance of peak LOD score position from the left side marker

b): Peak LOD score of significant marker interval

c): Explained variance of peak LOD score

d): Estimated additive effect

【産業上の利用可能性】

【0058】

本発明にかかる遺伝マーカーは、大麦縞萎縮病抵抗性オオムギの育種、大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子の単離等に用いることができ、育種の効率化に大きく貢献することが期待される。また、本発明にかかる遺伝マーカーの利用により作出される大麦縞萎縮病抵抗性オオムギにより、大麦縞萎縮病による病害を抑制すれば、収量や品質の低下を防止することができる。したがって、本発明は広く農業全般に利用可能であり、さらには、オオムギを原料とする食品産業においても有効である。

【図面の簡単な説明】

【0059】

【図1】オオムギESTクローン: baak1j14の塩基配列、および当該配列に基づいて設計されたプライマー配列の位置を示す図である。

【図2】遺伝マーカー k00256における、H602とはるな二条との間のSNPおよびSNP周囲の塩基配列を示す図である。

【図3】オオムギESTクローン: bags32m16の塩基配列、および当該配列に基づいて設計されたプライマー配列の位置を示す図である。

【図4】遺伝マーカー k02948における、H602とはるな二条との間の断片長多型を示す電気泳動画像である。

【図5】オオムギESTクローン: bah41103の塩基配列、および当該配列に基づいて設計されたプライマー配列の位置を示す図である。

【図6】遺伝マーカー k04143における、H602とはるな二条との間のSNPおよびSNP周囲の塩基配列を示す図である。

【図7】オオムギESTクローン: baak14i02の塩基配列、および当該配列に基づいて設計されたプライマー配列の位置を示す図である。

【図8】遺伝マーカー k00169における、H602とはるな二条との間のSNPおよびSNP周囲の塩基配列を示す図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> Genetic markers that link to the QTL of resistance to
barley yellow mosaic virus, and usage thereof

<130> A181P125

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 1

cttggccttg atcttctgct

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 2

gaccgtgtca ggaaagcaat

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 3

tctttcctgg gttggtgaac

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially synthesized primer sequence

<400> 4

gcagcttttg agttcgttcc

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially synthesized primer sequence

<400> 5

ctgtttggat gactgcgaga

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially synthesized primer sequence

<400> 6

attacgcaac ctgatggagc

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially synthesized primer sequence

<400> 7
accccggaag ctaagatgat 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 8
agtcggaaca tgcggtacac 20

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Hordeum vulgare

<400> 9
atcttctgca ggcacttgct g 21

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Hordeum vulgare

<400> 10
atcttctgca agcacttgct g 21

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Hordeum vulgare

<400> 11
tgccgtggcc gtgcacgatg a 21

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Hordeum vulgare

<400> 12
tgccgtggcc atgcacgatg a

21

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Hordeum vulgare

<400> 13
attactcagc tacacaccta t

21

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Hordeum vulgare

<400> 14
attactcagc cacacaccta t

21

<210> 15
<211> 688
<212> DNA
<213> Hordeum vulgare

<400> 15
gcagtaagtg gaggacaaaa aggaatactg ggattagata gaatgtagcg acattctgcg 60
gggtggggtg gtataagtag atatacagaa cggaggaccg tctcctggtc ctcagctttg 120
ggtcttctct accttggcct tgatcttctg ctcgaggacc gccttctccg tgctcgaggtt 180
gaacatcctg ttgagggcgt gcatgttgtc gagcgtctcg tccaggggtgc ggctgtcgt 240
gccatcgcat ctcagggtgt gcaacgggccc gtggaggagc ttgttacta tgcccgtgct 300
cagctcttcg atagaccttc tcgtcttctt gttgaggttg tcttccccga tcttctgcag 360
gcacttgtcg agctcggatg ccctgacct gtcggcatac gacctcagct ttttgatggt 420
cgggaccgtc tccagcgagt ccctccacgc ctcgaaccgc ttcagttctt ggggtgatgat 480
tgcttgggcc tccattgctt tcctgacacg gtcttccttg ttggcttcca ccacctctt 540
caagtcgtca acattgtata cccgtgcgtg ctccactga gataggcagg caccgacgtt 600
ccttgggacg gatatgtcga cgaaaagccg aacaccacc atggcaagag agataggagg 660
aagcgccctc gcatgcccct tggatgaat 688

<210> 16
<211> 645
<212> DNA
<213> Hordeum vulgare

<400> 16
agatgacagc taggccctga gcaggggaca catgaatatt tcccgtcac taccctatct 60
atactatcca gtatctacac atgaatattt ccagagattt tgctattatg atactgcgat 120

caagaactgt ctgcaaaatc aagaaacact attttgatta cgtccctatg atatactgct 180
 agttcctata tatctttcct gggttggtga acttgagctt ctgactgact gcttggtagg 240
 ttcatctccg tgttctctg gacttgaagg tgtgaggaag ggcatgcctc cagagaagaa 300
 aagcgtgttg tgtgcctacc aaacttgctt cgttgacagc ccaagggcag gtccccacgt 360
 gtcgtcgctt tattttcctt cttttcataa acaccttcaa acttttttca accacgcgct 420
 gcaactggaa gtaatgattg tacaggctct tctttaattc aaatcacacg caacgtcacā 480
 aatactaacc ttgacatgcc tggaactggc agtgtggcta ccatccacct tcgcctagtt 540
 gccatgtata aagatacggg ggagcttggt ggcatgacc gcataaggaa cgaactcaaa 600
 agctgcttaa tgaggacaag acatctaatt aagaacaatt gaaga 645

<210> 17

<211> 696

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<220>

<221> unsure

<222> (10, 24, 30)

<400> 17

catgcacatn aattgaatac aggnactagn aacttacaat acataagcgt gacgacattc 60
 cataactcca atgtgatttt agtagtcacg tacaacatga tctaattatt attatggcgc 120
 catccaattc ttagcgaccg acgagatgtt ttcacgttg tttgtagtaa caaaaacag 180
 agtagactgt ttggatgact gcgagaagta agccaatagc agctgccatg agcccaacgg 240
 caagccatgg gtctctcaag tacctctgcc ttagccaggc agtccacctc cgggggttgc 300
 tctggaaccg cttctccagc tctttgcatg tctcccgtag gtagttgcag ccgggggtcat 360
 caggggtcaaa cataatcccc ttgcaaaggt cgacgaagca tttggccacc tcttcgttgt 420
 tgccgtggcc gtgcacgatg acgcctctcc tcaccaagag ctccacgtcc ttcgtggtgc 480
 aggccatctg ggacatgaac acgcagtatg ccgtgacatg gctccccacc gtctcccggt 540
 tctctgtctc cagctccatc aggttgcgta atagccgcca cgtctcggcg tcgatgtcca 600
 ggacggggat ctccagcgta ccgccaccgc cgtccagctt cacgtcgagg atgcagcgga 660
 tgacaccctt ctgctcatg gccccgggcg ttgaac 696

<210> 18

<211> 738

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 18

aatcttagca ttcctgttct ctatttacga attacctaatt ggtaatgcat gagcagtagt 60
 cacaggataa cttccgatac ctccaagcag ttgcaactca taagatgaaa ttattttaca 120
 agagtggcca tgactaccta ccctacctgc tatctacagt tttttttgga tatactattc 180
 acagtgtgtg tcgaagagac gtaaccaatc taggaacata catgggcaag gaatgacccc 240
 ggaagctaag atgatgaatt ggaagaggag tcatgtacac aacctactta tagactatat 300
 ataatttttag ggccatttct caaccaacac ctatttgaca agggcaagaa ttttacttcg 360
 tattgatgaa acagatatca caattcacca ttacggcatt acttacctag ttgatgcaa 420
 agaaacttaa taatatctaa gaaactatcc acctaaggaa tgaccagaga agctgagatg 480
 atgaattgga aggagtcaaa tacagaaccc attttttagat tatatgtaca aaattttagg 540

gtcattactic agccacacac ctatttgaaa acaacaggaa gaattttact tagtcatgat 600
gaaacagatt tcttttaaca aataagaatt cgactactcc ttagatatct aaagatggat 660
gacgtagcca gataccatgt agaacactga aaaggcgtgt accgcatgtt ccgactgaag 720
actatcaatc atggttaag 738

【書類名】図面

【図1】

GCAGTAAGTGGAGGACAAAAAGGAATACTGGGATTAGATAGAATGTAGCG
ACATTCTGCGGGGTGGGGTGGTATAAGTAGATATACAGAACGGAGGACCG
TCTCCTGGTCCTCAGCTTTGGGTCTTCTCTACCTTGGCCTTGATCTTCTG
CTCGAGGACCGCCTTCTCCGTGTGAGGTTGAACATCCTGTTGAGGGCGT
GCATGTTGTGAGCGTCTCGTCCAGGGTGC GGCTGTGCTGCCATCGCAT
CTCAGGTGCTGCAACGGGCCGTGGAGGAGCTTGTTCACTATGCCCGTGCT
CAGCTCTTCGATAGACCTTCTCGTCTTCTTGTTGAGGTTGTCTTCCCCGA
TCTTCTGCAGGCACTTGTCGAGCTCGGATGCCCTGATCCTGTGCGGCATAC
GACCTCAGCTTTTTGATGGTCGGGACCGTCTCCAGCGAGTCCCTCCACGC
CTCGAACCGCTTCAGTTCTTGGGTGATGATTGCTTGGGCCTCCATTGCTT
TCCTGACACGGTCTTCCTTGTTGGCTTCCACCACCTCTTTCAAGTCGTCA
ACATTGTATACCGTGCGTGCTCCACTTGAGATAGGCAGGCACCGACGTT
CCTTGGGACGGATATGTGACGAAAAGCCGAACACCACCCATGGCAAGAG
AGATAGGAGGAAGCGCCTCCGCATGCCCTTGGTGAAT

【図2】

H602 : ATCTTCTGCA G GCACTTGTCTG

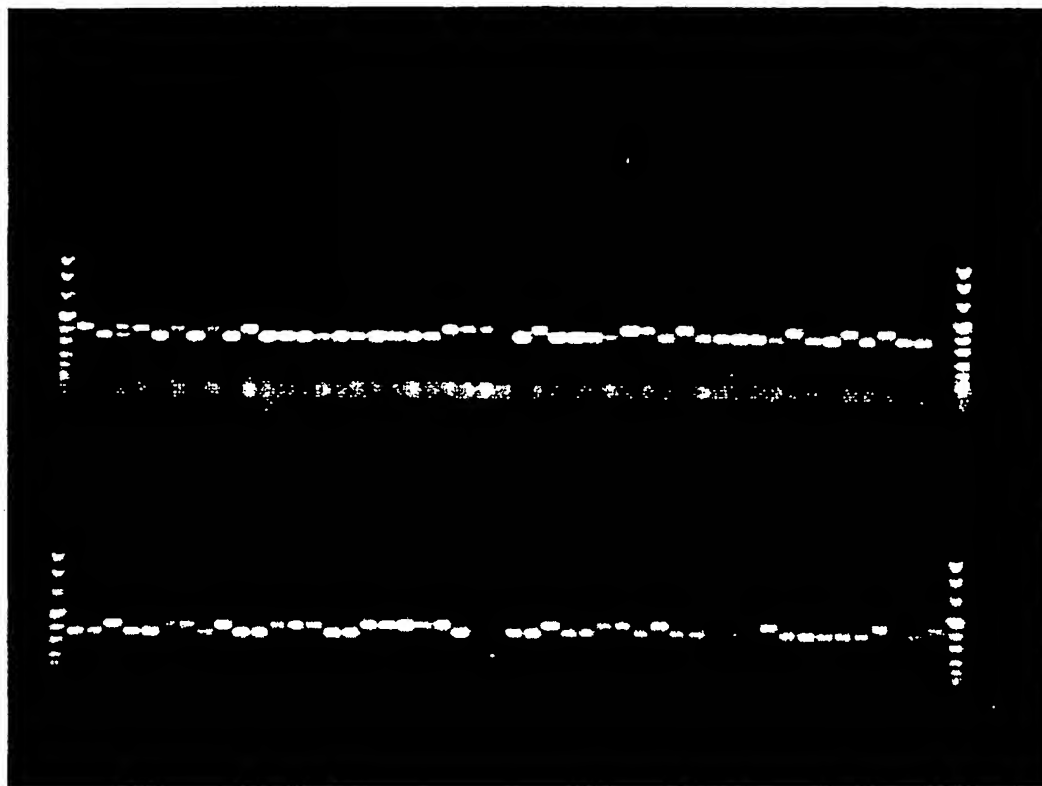
PstI

はるな二条 : ATCTTCTGCA A GCACTTGTCTG

【図3】

AGATGACAGCTAGGCCCTGAGCAGGGGACACATGAATATTTCCCGCTCAC
TACCCTATCTATACTATCCAGTATCTACACATGAATATTTCCAGAGATTT
TGCTATTATGATACTGCGATCAAGAACTGTCTGCAAAATCAAGAAACACT
ATTTTGATTACGTCCCTATGATATACTGCTAGTTCCTATATATCTTTCTT
GGGTTGGTGAACCTTGAGCTTCTGACTGACTGCTTGGTAGGTTCATCTCCG
TGTTCTCTGGACTTGAAGGTGTGAGGAAGGGCATGCCTCCAGAGAAGAA
AAGCGTGTTGTGTGCCTACCAAACCTTGCTTCGTTGACAGCCCAAGGGCAG
GTCCCCACGTGTGCTCGCTTTATTTTCTTCTTTTCATAAACACCTTCAA
ACTTTTTTCAACCACGGCTGCAACTGGAAGTAATGATTGTACAGGCTCT
TCTTTAATTCAAATCACACGCAACGTCAAAATACTAACCTTGACATGCC
TGGAACCTGGCAGTGTGGCTACCATCCACCTTCGCCTAGTTGCCATGTATA
AAGATACGGTGGAGCTTGTTGGCATTGACCGCATAAGGAACGAACCTCAA
AGCTGCTTAATGAGGACAAGACATCTAATGAAGAACAATTGAAGA

【図4】



【図5】

CATGCACATNAATTGAATACAGGNACTAGNAACTTACAATACATAAGCGT
GACGACATTCCATAACTCCAATGTGATTTTAGTAGTCACGTACAACATGA
TCTAATTATTATTATGGCGCCATCCAATTCTTAGCGACCGACGAGATGTT
TTCATCGTTGTTTGTAGTAACACAAAACAGAGTAGACTGTTTGGATGACT
GCGAGAAGTAAGCCAATAGCAGCTGCCATGAGCCCAACGGCAAGCCATGG
GTTCCCTCAAGTACCTCTGCCTTAGCCAGGCAGTCCACCTCCGGGGGTTGC
TCTGGAACCGCTTCTCCAGCTTCTTGCAATGTCTCCCGTAGGTTAGTTGCAG
CCGGGGTTCATCAGGGTCAAACATAATCCCCTTGCAAAGGTCGACGAAGCA
TTTGGCCACCTCTTCGTTGTTGCCGTGGCCGTGCACGATGACGCCTCTCC
TCACCAAGAGCTCCACGTCCTTCGTGGTGCAGGCCATCTGGGACATGAAC
ACGCAGTATGCCGTGACATGGCTCCCCACCGTCTCCCGGTTCTCTGCTC
CAGCTCCATCAGGTTGCGTAATAGCCGCCACGTCTCGGCGTCGATGTCCA
GGACGGGGATCTCCAGCGTACCGCCACCGCCGTCCAGCTTCACGTCGAGG
ATGCAGCGGATGACACCCTTCTCGCTCATGGCCCCGGGGCGTTGAAC

【図6】

H602 : TGCCGTGGCC G TGCACGATGA

ApaI

はるな二条: TGCCGTGGCC A TGCACGATGA

【図7】

AATCTTAGCATTCTGTTCTCTATTTACGAATTACCTAATGGTAATGCAT
GAGCAGTAGTCACAGGATAACTTCCGATACCTCCAAGCAGTTGCAACTCA
TAAGATGAAATTATTTACAAAGAGTGGCCATGACTACCTACCCTACCTGC
TATCTACAGTTTTTTTTTGGATATACTATTCACAGTTGGTGTGGAAGAGAC
GTAACCAATCTAGGAACATACATGGGCAAGGAATGACCCCGGAAGCTAAG
ATGATGAATTGGAAGAGGAGTCATGTACACAACCTACTTATAGACTATAT
ATAATTTTAGGGCCATTTCTCAACCAACACCTATTTGACAAGGGCAAGAA
TTTTACTTCGTATTGATGAAACAGATATCACAAATTCACCATTACGGCATT
ACTTACCTAGTTGATGCCAAAGAACTTAATAATATCTAAGAACTATCC
ACCTAAGGAATGACCAGAGAAGCTGAGATGATGAATTGGAAGGAGTCAAA
TACAGAACCCATTTTTAGATTATATGTACAAAATTTAGGGTCATTACTC
AGCCACACACCTATTTGAAAACAACAGGAAGAATTTTACTTAGTCATGAT
GAAACAGATTTCTTTTAACAAATAAGAATTCGACTACTCCTTAGATATCT
AAAGATGGATGACGTAGCCAGATACCATGTAGAACACTGAAAAGGCGTGT
ACCGCATGTTCCGACTGAAGACTATCAATCATGGTAAG

【図8】

H602 : ATTA^{CT}CAGCTACACACCTAT

AluI

はるな二条: ATTA^{CT}CAGCCACACACCTAT

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 オオムギのゲノム DNA 中に存在し、大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーとその利用法を提供する。

【解決手段】 オオムギの詳細な連鎖地図を作成し、QTL 解析を行うことにより、オオムギ 1H 染色体上に座乗する大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する一組の遺伝マーカーと、オオムギ 3H 染色体上に座乗する大麦縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する一組の遺伝マーカーとを見出した。

【選択図】 なし

特願2004-090644

出願人履歴情報

識別番号

[503360115]

1. 変更年月日 2003年10月 1日
[変更理由] 新規登録
住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名 独立行政法人 科学技術振興機構
2. 変更年月日 2004年 4月 1日
[変更理由] 名称変更
住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名 独立行政法人科学技術振興機構